

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

(6)

PUBLICATION NUMBER : 2001204284
PUBLICATION DATE : 31-07-01

APPLICATION DATE : 26-01-00
APPLICATION NUMBER : 2000017281

APPLICANT : ALLERGEN FREE TECHNOLOGY KENKYUSHO:KK;

INVENTOR : IKEZAWA YOSHIRO;

INT.CL. : A01H 5/00 C12N 5/10 C12N 15/09

TITLE : TRANSGENIC RICE PLANT CONTAINING NON-RICE PLANT AMYLOSE SYNTHASE GENE

ABSTRACT : PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a transgenic rice plant or its cell capable of providing amylose-containing rice, namely, rice simultaneously satisfying low allergen and excellent flavor in spite of the absence of rice plant waxy protein being rice allergen.

SOLUTION: This transgenic rice plant or its cell has a genome to which a DNA encoding a non-rice plant amylose synthase lowly allergic to a rice allergic subject is transferred and contains no rice plant waxy protein or its fragment.

COPYRIGHT: (C)2001,JPO

not raising properties

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-204284

(P2001-204284A)

(43) 公開日 平成13年7月31日 (2001.7.31)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト (参考)
A 0 1 H 5/00		A 0 1 H 5/00	2 B 0 3 0
C 1 2 N 5/10		C 1 2 N 5/00	C 4 B 0 2 4
15/09		15/00	A 4 B 0 6 5

審査請求 未請求 請求項の数4 O L (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願2000-17281 (P2000-17281)

(22) 出願日 平成12年1月26日 (2000.1.26)

(71) 出願人 393028324

株式会社アレルゲンフリー・テクノロジー
研究所

東京都荒川区東尾久8丁目4番1号

(72) 発明者 勝俣 和子

東京都荒川区東尾久8丁目4番1号 株式
会社アレルゲンフリー・テクノロジー研究
所内

(74) 代理人 100090251

弁理士 森田 憲一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 非イネアミロース合成酵素遺伝子含有トランスジェニックイネ

(57) 【要約】

【課題】 米アレルゲンであるイネワキシイタンパク質を含まないにもかかわらず、アミロースを含有する米、すなわち、低アレルゲン性と良食味とを同時に満足することのできる米が得られるトランスジェニックイネ又はその細胞を提供する。

【解決手段】 前記トランスジェニックイネ又はその細胞は、米アレルギー患者に対して低アレルゲン性を示す非イネアミロース合成酵素をコードするDNAがゲノム中に導入されており、イネワキシイタンパク質又はその断片を含まない。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 米アレルギー患者に対して低アレルギー性を示す非イネアミロース合成酵素をコードするDNAがゲノム中に導入されており、イネワキシイタンパク質又はその断片を含まない、イネ。

【請求項2】 米アレルギー患者に対して低アレルギー性を示す非イネアミロース合成酵素をコードするDNAがゲノム中に導入されており、イネワキシイタンパク質又はその断片を含まない、イネ細胞。

【請求項3】 前記請求項1に記載のイネから得られる米。

【請求項4】 請求項3に記載の米に対し、アレルギー低減化処理を行なうことにより得られる、アレルギー低減化米調製物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、非イネアミロース合成酵素遺伝子含有トランスジェニックイネ（形質転換イネ）又はその細胞に関する。

【0002】

【従来の技術】 日常欠かすことのできない食物の摂取が、時として生体に異常な反応を引き起こすことがある。この中で、食物中の物質が抗原として認識され、一連の免疫学的機序により、喘息、湿疹などの症状を呈する病態は食物アレルギーと呼ばれている。食物アレルギー患者は、推定で人口の約1%弱とみられており、特に、小児においては、気管支喘息、アトピー性皮膚炎などの原因として食物アレルギーの発症頻度も高い。食物アレルギーは、一般に、牛乳、卵、大豆などが食物アレルギーの原因物質となることが多いといわれているが、近年では、米や小麦などの穀物によるアレルギーが増加している（小児科臨床、第38巻、第2545頁以下、1985年；小児内科、第22巻、第415頁以下、1990年）。

【0003】 食物アレルギー患者の治療法としては、薬物による対症療法その他、アレルギーの原因となる食物を制限、あるいは摂取させない方法が試みられているが、食物を制限することは、生命の維持、発育にも支障をきたしかねない。そこで、アレルギーを起こす成分のみを除去し、他の栄養成分は損なわないような食品を摂取させる方法が研究されている。

【0004】 近年、食物アレルギーを引き起こす成分、すなわちアレルギーについて研究が進み、米に関しては、グロブリンである分子量16kdのタンパク質やその他多くのタンパク質分子がアレルギーであることが報告されている（化学と生物、第25巻、第739頁以下、1987年）。

【0005】 穀類アレルギー、特に米アレルギーとしてのタンパク質は、従来から塩可溶性タンパク質が中心的に検討されてきている。従って、米アレルギー患者に対

しては、米にその塩可溶性タンパク質を除去ないし低減化する処理を施したアレルギー低減化米が与えられてきた。しかしながら、本発明者及びその共同研究者は、米アレルギーである塩可溶性タンパク質を除去ないし低減化した処理米によってもアレルギーを発症する患者がいることを見出し、塩可溶性タンパク質以外の複数の米アレルギーの存在を確認し、更に、それらのアレルギータンパク質を同定すると共に、それら米アレルギーの中には、米だけでなく広く穀類（特に、トウモロコシ及び小麦）に相同性の高いタンパク質が存在することを確認し、そして新たに発見したアレルギーを低減化した穀類調製物の製造方法を既に見出している（特開平10-179059号公報）。

【0006】 より詳細に述べれば、前記特開平10-179059号公報には、塩可溶性タンパク質以外の米アレルギーの1つとして、イネのアミロース合成酵素の1つであるワキシイ（waxy）タンパク質（UDPグルコースターチグルコシルトランスフェラーゼ）（Plant Mol. Biol., 19, 513-516, 1992）が開示されている。そして、前記公報に記載の前記製造方法では、ワキシイタンパク質が欠如ないし低減した穀類に対し、アレルギー低減化処理（例えば、塩水溶液処理）を行なう。ワキシイタンパク質含量が低い穀類として、モチ品種穀類、例えば、モチ米、モチ小麦、又はモチトウモロコシを使用することができ、モチ品種穀類のほとんどはワキシイタンパク質を欠損していることが、前記公報に開示されている。前記公報に記載の前記製造方法により調製した米調製物、例えば、ワキシイタンパク質と米アレルギーである塩可溶性タンパク質とを欠如又は低減したアレルギー低減化米調製物は、従来のアレルギー低減化米調製物よりも一層多くの米アレルギー患者に与えることが可能である。

【0007】 ところで、米においては、良食味を有する食用米のアミロース含量は、通常、15~18%程度であることが知られている。一方、前記ワキシイタンパク質は、デンプンの主要成分であるアミロース及びアミロペクチンの内、アミロースの合成に必須の酵素であるため、ワキシイタンパク質を欠損している穀類（例えば、モチ品種穀類）には、アミロースが全く含まれていない。従って、前記特開平10-179059号公報に記載の製造方法により調製したアレルギー低減化米調製物は、低アレルギー性を示す点で優れているものの、アミロース含有米とは異なった食味を有しており、食味の改善が望まれていた。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】 従って、本発明の課題は、米アレルギーであるイネワキシイタンパク質を含まないにもかかわらず、アミロースを含有する米、すなわち、低アレルギー性と良食味とを同時に満足することのできる米が得られるイネを提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】前記課題は、本発明による、米アレルギー患者に対して低アレルギー性を示す非イネアミロース合成酵素をコードするDNAがゲノム中に導入されており、イネワキシイタンパク質又はその断片を含まない、イネにより解決することができる。また、本発明は、米アレルギー患者に対して低アレルギー性を示す非イネアミロース合成酵素をコードするDNAがゲノム中に導入されており、イネワキシイタンパク質又はその断片を含まない、イネ細胞に関する。また、本発明は、前記イネから得られる米に関する。更に、本発明は、前記米に対し、アレルギー低減化処理を行なうことにより得られる、アレルギー低減化米調製物に関する。

【0010】本明細書において、「イネ」には、植物体（すなわち、イネ全体）及びその一部〔例えば、花、葉、茎、根、若しくは種子、又は組織〕が含まれる。また、「イネ細胞」には、例えば、分化していないイネの細胞又は分化していないイネの組織培養物、あるいは、プロトプラスト、カルス（細胞集塊）、不定胚、又は不定芽が含まれる。更に、本明細書において、「米」には、イネの種子それ自体及びその一部が含まれ、例えば、籾、玄米、又は精米（部分精米も含む）を挙げることができる。

【0011】

【発明の実施の形態】本発明によるトランスジェニックイネ又はその細胞は、（1）イネワキシイタンパク質又はその断片を含まず、そして、（2）ゲノム中に、米アレルギー患者に対して低アレルギー性を示す非イネアミロース合成酵素（以下、「低アレルギー性非イネアミロース合成酵素」と称する）をコードするDNAを含む。

【0012】本明細書における「イネワキシイタンパク質」とは、アミロース合成酵素の1つであって、アミノ酸532残基からなる分子量60kdのタンパク質である（Plant Mol. Biol., 19, 513-516, 1992）。イネワキシイタンパク質は、デンプンの主要成分であるアミロース及びアミロペクチンの内、アミロースの合成に必須の酵素であり、また、米アレルギーのアレルゲンになりうる。

【0013】本明細書において「イネ又はその細胞がイネワキシイタンパク質又はその断片を含まない」状態とは、イネ又はその細胞において、イネワキシイタンパク質が、その酵素活性の有無に関わらず、米アレルギー患者に対してアレルギー性を示すタンパク質又はその断片として含まれていない（すなわち、発現されていない）状態を意味する。

【0014】このような状態のイネ又はその細胞としては、例えば、（1）イネワキシイタンパク質をコードする遺伝子が欠損している（天然の変異体と、遺伝子工学的に人為的に欠損させた変異体との両方を含む）ため、

イネワキシイタンパク質が発現されないイネ又はその細胞、あるいは、（2）イネワキシイタンパク質をコードする遺伝子は存在するものの、例えば、転写及び／又は翻訳の段階に異常があり、その結果、イネワキシイタンパク質が発現されないイネ又はその細胞を挙げることができる。なお、イネワキシイタンパク質としての酵素活性を示さない不活性型イネワキシイタンパク質、あるいは、前記酵素活性を示さないイネワキシイタンパク質の部分断片が、イネ又はその細胞で発現されている状態は、それらがアレルギー性を示す場合には、前記定義から明らかなように、「イネ又はその細胞がイネワキシイタンパク質を含まない」状態に該当しない。

【0015】本発明のトランスジェニックイネ又はその細胞において、それらが含有するDNAがコードする「低アレルギー性非イネアミロース合成酵素」は、

（1）イネワキシイタンパク質に代わって、イネにおいてアミロース合成を行なうことができ、しかも、（2）米アレルギー患者に対して低アレルギー性を示す限り、特に限定されるものではない。なお、本明細書において「非イネ」とは、イネ以外の全生物、例えば、イネ以外の植物、動物、又は微生物を意味する。

【0016】イネワキシイタンパク質に代わって、イネにおいてアミロース合成を行なうことができる酵素（すなわち、アミロース合成酵素）としては、これに限定されるものではないが、例えば、非イネ植物におけるイネワキシイタンパク質に相当するタンパク質、例えば、イネ以外のイネ科植物のワキシイタンパク質、あるいは、イネ科植物以外の植物（非イネ科植物）のデンプン粒結合型スターチシンターゼ（granule bound starch synthase; GBSS）を挙げることができる。ワキシイタンパク質とGBSSとは、生化学的性質が似ているだけでなく、部分アミノ酸配列が互いに高い相同性を有する。

【0017】或るアミロース合成酵素が、米アレルギー患者に対して低アレルギー性を示すか否かを判定する手段としては、例えば、複数の米アレルギー患者の血清と健康人の血清（コントロール血清）とを用いるELISA（enzyme-linked immunosorbent assay）法を挙げることができる。例えば、後述する参考例2に示す手順により実施することができる。複数の米アレルギー患者の血清について、米ワキシイタンパク質に対するELISA値と、アレルギー性を判定したいアミロース合成酵素（判定対象酵素）に対するELISA値とをそれぞれ測定し、その検査値（ELISA値）を3段階、すなわち、陰性、弱陽性〔すなわち、陽性（+）〕、及び強陽性〔すなわち、陽性（++）〕に区分した場合に、米アレルギー患者の半数以上（好ましくは80%以上）が、米ワキシイタンパク質に対するELISA値に比べて、判定対象酵素に対するELISA値が1段階以上低下していれば、米アレルギー

患者に対して低アレルギー性を示すと判定することができる。

【0018】本発明のトランスジェニックイネ又はその細胞において、それらが含有するDNAがコードする「低アレルギー性非イネアミロース合成酵素」としては、例えば、イネ以外のイネ科植物（例えば、トウモロコシ）のワキシイタンパク質、ヒルガオ科植物（例えば、サツマイモ）のデンプン粒結合型スターチシンターゼ（GBSS）、ナス科植物（例えば、ジャガイモ）のGBSS、又はマメ科植物（例えば、クズ）のGBSSを挙げることができる。

【0019】なお、本明細書における「非イネアミロース合成酵素」には、天然体のアミロース合成酵素が含まれることは勿論のこと、その機能的等価改変体、例えば、変異体、遺伝子工学的に得られるリコンビナントタンパク質、あるいは、アミノ酸配列が、アミロース合成酵素のアミノ酸配列において1又はそれ以上（好ましくは1又は数個）のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列であるタンパク質（但し、アミロース合成酵素活性を有するものに限る）も含まれる。

【0020】本発明のトランスジェニックイネは、これに限定されるものではないが、例えば、イネワキシイタンパク質を発現することができないイネ由来の細胞に、それ自体公知の方法により、低アレルギー性非イネアミロース合成酵素をコードするDNAを導入し、得られたトランスジェニック植物細胞を増殖及び個体再分化させることによって、得ることができる。

【0021】また、本発明のトランスジェニックイネ細胞は、これに限定されるものではないが、例えば、イネワキシイタンパク質を発現することができないイネ由来の細胞に、それ自体公知の方法により、低アレルギー性非イネアミロース合成酵素をコードするDNAを導入することによって、得ることができる。

【0022】本発明のトランスジェニックイネ又はその細胞を調製するのに用いることのできるイネ細胞、すなわち、イネワキシイタンパク質を発現することができないイネ由来の細胞としては、公知のイネの細胞をそのまま使用することもできるし、あるいは、品種選抜、突然変異体の作成、又は遺伝子工学的手法によって作出したイネの細胞を使用することもできる。

【0023】イネワキシイタンパク質を発現することができないイネとしては、例えば、モチ品種イネを使用することができる。モチ品種イネのほとんどはワキシイタンパク質を欠損している〔平野博之著「種子のバイオサイエンス」（1995年）学会出版センター、第117頁～第122頁〕。また、変異源処理によるワキシイ突然変異体も多く分離され、タンパク質が不活性型となって発現している変異体、あるいは、タンパク質自体を欠損している変異体等が得られており（タンパク質・核酸・酵素、第37巻、第1317頁～第1325頁、19

92年）、後者の変異体、すなわち、タンパク質自体を欠損している変異体を用いることができる。

【0024】更に、遺伝子工学的手法においては、例えば、アンチセンス技術により、このワキシイタンパク質の発現を抑制したイネを作成することができる（例えば、特開平4-104791号、特開平5-13981号、及び特開平5-168482号各公報）。その抑制のためには、プロモーターとして、イネ胚乳で発現が認められているイネワキシイプロモーター、トウモロコシAdh1プロモーター、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター、又はイネアレルギープロモーター等を用いることができる。また、ターミネーターとしては、ノバリン合成酵素遺伝子NOSTターミネーター、又はカリフラワーモザイクウイルス35SRNAターミネーター等を挙げることができる。

【0025】低アレルギー性非イネアミロース合成酵素をコードするDNAを、イネワキシイタンパク質を発現することができないイネ細胞のゲノムに導入する際には、前記DNAを適当なベクターに挿入することによって、前記DNAを含むベクターを構築し、このベクターを用いてイネ細胞を形質転換することが好ましい。また、前記ベクターには、前記DNAに加えて、前記DNAの上流及び下流に、それぞれ、イネの種子内で機能するプロモーター及びターミネーターを挿入することが更に好ましい。

【0026】また、イネ種子内で、イネワキシイタンパク質は、そのほとんどがアミロプラストに局在していることが知られている。また、イネを含む種々の植物におけるワキシイタンパク質の前駆体には、そのアミノ末端に、アミロプラストへの輸送に重要な働きをすると考えられているトランジットペプチド（例えば、イネワキシイタンパク質のトランジットペプチドは77アミノ酸残基からなり、ジャガイモGBSSのトランジットペプチドは77アミノ酸残基からなり、トウモロコシワキシイタンパク質のトランジットペプチドは72アミノ酸残基からなる）が存在することも知られている。従って、低アレルギー性非イネアミロース合成酵素をコードするDNAを、イネワキシイタンパク質を発現することができないイネ細胞のゲノムに導入する際には、前記低アレルギー性非イネアミロース合成酵素のアミノ末端に、アミロプラストへの輸送に重要な働きをすると考えられているトランジットペプチドが付加するように、ベクターを構築することが好ましい。

【0027】イネ種子内で機能するプロモーターとしては、例えば、イネワキシイタンパク質プロモーター、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター（ザ・エンボジャーナル、第6巻、第3901頁～第3907頁、1987年）、イネアクチンプロモーター（ザ・プラントセル、第2巻、第163頁～第171頁、1990年）、イネグルテリンプロモーター（プラント・モレ

キュラー・バイオロジー、第30巻、第1207頁～第1221頁、1996年)、又はトウモロコシ・ユビキチンプロモーター(プラント・モレキュラー・バイオロジー、第26巻、第1007頁～第1012頁、1994年)等を使用することができ、イネの種子特異的に高発現させることが可能である点で、イネワキシイタンパク質プロモーター及びイネグルテリンプロモーターが好ましく、イネワキシイタンパク質プロモーターが特に好ましい。

【0028】イネ種子内で機能するターミネーターとしては、例えば、ノバリンシンターゼターミネーター、又はカリフラワーモザイクウイルス35Sターミネーター等を用いることができる。

【0029】前記ベクターにおいて、前記プロモーターを含む配列内の、プロモーターの制御配列を含む配列の3'末端と、前記ターミネーターを含む配列内の、ターミネーターの制御配列を含む配列の5'末端との間に、イネで機能することのできるイントロンを更に設けると、遺伝子の発現効率を向上させることができたり、あるいは、mRNAの安定性を向上させることができる。前記イントロンとしては、例えば、ヒマカターゼイントロン(ヌクレック・アシッド・リサーチ、第18巻、第6767頁～第6770頁、1990年)、又はトウモロコシユビキチンイントロン(プラント・モレキュラー・バイオロジー、第26巻、第1007頁～第1012頁、1994年)を使用することができるが、トウモロコシユビキチンイントロンが特に好ましい。

【0030】パーティクルガン法などの直接的な遺伝子導入法を利用する場合には、イネ細胞内で発現可能な、低アレルゲン性非イネアミロース合成酵素をコードするDNAを含むカセットと、イネ細胞内で発現可能な選択マーカー遺伝子のカセットとを、大腸菌で一般的に用いられる多コピープラスミド[例えば、pUC19(宝酒造製)]にクローン化してイネ細胞に導入することができる。この際、選択マーカー遺伝子は、(1)同一プラスミド上に保持させて導入することもでき、あるいは(2)別々のプラスミド上に保持させ混合して導入する(コトランスフォーメーション)こともできる。例えば、ビアラホス耐性(bar)遺伝子(モレキュラー・ジェネラル・ジェネティクス、第205巻、第42頁～第50頁、1986年)が、イネアクチンプロモーターとノバリンシンターゼターミネーターとの間に含まれているプラスミドpDM302(プラント・セル・レポート、第11巻、第586頁～第591頁、1992年)と、低アレルゲン性非イネアミロース合成酵素をコードするDNAを有するプラスミドとを混合してコトランスフォームさせることにより、イネ細胞に遺伝子を導入することができる。

【0031】また、アグロバクテリウムを介した導入法を用いる場合には、イネ細胞内で発現可能な、低アレル

ゲン性非イネアミロース合成酵素をコードするDNAを含むカセットと、イネ細胞内で発現可能な選択マーカー遺伝子のカセットとを含むアグロバクテリウム用のバイナリープラスミドを作成し、イネ細胞に導入することができる。例えば、低アレルゲン性非イネアミロース合成酵素をコードするDNAを、バイナリーベクターpBI121(クローンテック社製)の35Sプロモーターとノバリンシンターゼターミネーターとの間にクローン化し、前記DNAを含むバイナリープラスミドを有するアグロバクテリウムをイネ細胞に感染させ、カナマイシン耐性により選択して形質転換細胞を得ることができ、更にその形質転換細胞から植物体を得ることができる。

【0032】選択マーカー遺伝子としては、ハイグロマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、又はbar遺伝子などを用いることができ、bar遺伝子が特に好ましい(プラント・モレキュラー・バイオロジー、第26巻、第1007頁～第1012頁、1994年)。

【0033】構築したプラスミドをイネに導入する方法としては、イネの形質転換法として確立されている任意の方法を利用することができる。例えば、エレクトロポレーションやポリエチレングリコールによる植物プロトプラストへの直接導入法、マイクロプロジェクトイルを利用して植物細胞に直接導入するパーティクルガン法、あるいは、アグロバクテリウムを介した導入法を用いることができる。パーティクルガン法又はアグロバクテリウムを介した導入法が好ましい。また、形質転換する細胞としては導入方法に適した細胞や組織を用いることができ、例えば、適切な組織として未熟種子、完熟種子より摘出した胚、あるいは、誘導したカルスを用いることができる。

【0034】前記方法により得られた遺伝子を導入した細胞又は組織を選択し、任意の方法により植物体を再生させることができる。例えば、遺伝子を導入した組織を選択マーカーに対応した選択薬剤及び植物ホルモンを含む培地に移植して数週間培養すれば、形質転換した細胞(カルス)を得ることができる。その後、得られた細胞(カルス)を適切な増殖培地に移し、更に、適切な再分化培地で培養すれば、形質転換したイネ植物体を得ることができる。なお、低アレルゲン性非イネアミロース合成酵素の発現は、免疫学的な解析により確認することができる。

【0035】本発明のトランスジェニックイネから得られる本発明の米に対して、更に、アレルゲン低減化処理を行なうことにより、本発明のアレルゲン低減化米調製物を調製することができる。前記アレルゲン低減化処理は、米ワキシイタンパク質以外の米アレルゲンを除去又は低減することができる限り、特に限定されるものではなく、公知のアレルゲン低減化方法により実施することができる。

【0036】このような公知のアレルゲン低減化方法と

しては、例えば、特開平10-179059号公報に記載のアレルゲン低減化方法、例えば、タンパク質分解酵素（例えば、ババイン、コラゲナーゼ、トラスグルタミナーゼ、又はカルボキシペプチダーゼ）で処理する方法、塩〔例えば、無機酸の塩（例えば、塩酸塩、硫酸塩、炭酸塩、又は磷酸塩）やアルカリ金属塩（例えば、ナトリウム塩又はカリウム塩）〕水溶液、低級アルコール（例えば、エタノール）、アルカリ性水溶液（好ましくはpH7~10、より好ましくはpH8~10に調製した水溶液）、及び／又は酸性水溶液（好ましくはpH5以下、より好ましくはpH4以下に調製した水溶液）に接触させる方法、あるいは、糖類及び糖類分解微生物（例えば、乳酸菌）を分散した溶液で発酵処理する方法、更には、それらを適宜組み合わせる方法を挙げることができる。

【0037】

【実施例】以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【参考例1】《各種イネ科植物ワキシタンパク質及びジョガイモデンプン粒結合型スターチシンターゼ（GBSS）の調製》始めに、市販の米粒、コムギ粒、及びトウモロコシ粒から、以下の手順に従って、デンプン粉末をそれぞれ調製した。また、ジャガイモについては、市販の片栗粉（馬鈴薯澱粉100%の表示）をデンプン粉末として用いた。以下、米粒を用いた場合の調製手順について記載するが、コムギ粒又はトウモロコシ粒についても同様に実施した。

【0038】すなわち、米粒をコーヒーマルにて破碎して得られた粉末1gを、抽出バッファー〔2.3%ドデシル硫酸ナトリウム（以下、SDSと称する）、5%-2-メルカプトエタノール、10%グリセロール〕10mlに懸濁し、30分間振盪した。続いて、12000回転で5分間遠心し、得られた沈殿を再び前記抽出バッファー10mlに懸濁し、30分間振盪した後、12000回転で5分間遠心した。得られた沈殿を水10mlに懸濁し、20分間振盪した後、12000回転で5分間遠心し、得られた沈殿に対してこの操作をもう一度繰り返した。得られた沈殿をアセトン10mlに懸濁し、15分間振盪した後、12000回転で5分間遠心し、得られた沈殿についてこの操作をもう一度繰り返した。最後に、沈殿を自然風乾することにより、白色のデンプン粉末を取得した。

【0039】次に、各種デンプン粉末から、以下の手順に従って、ワキシタンパク質又はGBSSをそれぞれ抽出した。すなわち、各種デンプン粉末20mgをプラスチックチューブ（エペンドルフチューブ）に秤量し、前記抽出バッファー200μlに懸濁し、100℃で5分間煮沸した後、氷冷した。更に、抽出バッファー200μlを加え、ゲル化部分を葉さじで粉碎し、よく

混合した。12000回転で5分間遠心した後、上清を新しいプラスチックチューブに移した。この溶液に3倍容量のアセトンを加え、よく混合し、フリーザー（-40℃）に一晩静置した。12000回転で5分間遠心して得られる沈殿を、等容量の8mol/l尿素液に溶解し、ワキシタンパク質サンプル又はGBSSサンプルとして以下の実験に供した。

【0040】

【参考例2】《米アレルギー患者血清を用いた各種ワキシタンパク質又はGBSSのアレルゲン性評価》前記参考例2で調製したワキシタンパク質サンプル及びGBSSサンプルについて、米アレルギー患者血清中のIgE抗体との反応をELISA法にて測定した。すなわち、前記各種サンプルを、100倍容量のリン酸緩衝溶液（以下、PBSと称する）により希釈し、得られたサンプル希釈溶液100μlずつを、ELISA用プレート（ELISAプレート・マキシソープ；メルク社製）のウェルに加え、4℃にて一昼夜コーティングした。プレートの各ウェルをPBSにて2回洗浄した後、2%ウシ血清アルブミン（以下、BSAと称する）含有PBS250μlを加え、37℃にて1時間ブロッキングを行なった後、PBSにて2回洗浄した。米アレルギーと診断された患者14名から採取した血清、あるいは、健康な成人血清（コントロール血清）を、0.2%BSA及び0.05%界面活性剤トゥイーン20（Tween20）含有のPBSにて10倍容量に希釈し、それぞれの血清希釈液100μlをプレートに加え、室温にて一昼夜反応させた。

【0041】0.05%トゥイーン20含有のPBS（以下、PBS-Tと称する）にてプレートを4回洗浄した後、2次抗体として、ビオチンを結合したヒツジ抗ヒトIgE抗体（ベクター社製）の2,500容量倍希釈液100μlをプレートに加えて、37℃で2時間反応させた。なお、抗体の希釈には、0.2%BSAを含むPBS-Tを使用した。2次抗体との反応が終了した後、プレートをPBS-Tにて5回洗浄し、4,000容量倍希釈したアビジン結合ペルオキシターゼ（バーリンガー社製）を加えて酵素標識化した。再度、PBS-Tにてプレートを5回洗浄し、基質溶液（0.034% H_2O_2 を加えた0.1%オルトフェニレンジアミン溶液）100μlを加えた。37℃にて30分間正確に反応させた後、2mol/l- H_2SO_4 40μlを加えて発色を停止させ、吸光度（490nm）を測定した。測定はすべて二重に行ない、その平均値を求めた。

【0042】結果を表1に示す。コントロール血清を用いた場合のELISA値の平均値とSD値の2倍との和が0.030であったので、ELISA値が0.03以下の数値を示す場合を「陰性」とした。また、ELISA値が0.03を越え、0.1未満である場合（すなわち、弱陽性である場合）を「陽性（+）」とし、EL

ISA値が0.10以上である場合(すなわち、強陽性である場合)を「陽性(++)」として、表1に示した。この結果、米アレルギー患者血清中のIgE抗体の各作物のワキシタンパク質又はGBSSとの反応性に

《表1》

	陰性	陽性(+)	陽性(++)
米	—	6名	8名
コムギ	5名	3名	6名
トウモロコシ	7名	7名	0名
ジャガイモ	9名	3名	2名

【0044】

【実施例1】《ジャガイモデンプン粒結晶型スターチシンターゼ(GBSS)のcDNAを導入したトランスジェニックイネの作製》

(1) ジャガイモGBSSのcDNAの調製

ジャガイモ品種男爵から、フェノール-SDS法[渡辺格監修・杉浦昌宏編集「クローニングとシーケンシング・植物バイオテクノロジー実験マニュアル」(1989年)農村文化社、第30頁～第33頁]を用いて、全RNA(total RNA)画分を調製した。この全RNAを鋳型にして、マウス白血病ウイルス由来の逆転写酵素(MuLV-RT; 宝酒造)とプライマーであるオリゴdT(宝酒造)とを用いて逆転写反応を行ない、cDNAミックスを得た。このcDNAミックスと、公知のジャガイモGBSSのcDNA配列(MGG, 228, 240-248, 1991)に基づいてデザインしたPCR(polymerase chain reaction)プライマーPWAX3及びPWAX4とを用いたPCRを実施したところ、約2kbのDNA断片が増幅された。なお、前記プライマーPWAX3及びPWAX4の塩基配列は、以下のとおりである:

PWAX3: 5'-CTCAACAAGTGCTTGGTAGA-3'

PWAX4: 5'-GGTTCTACATAGTTCTGCTAG-3'

【0045】増幅されたDNA断片を、大腸菌ベクターpTZ18U(東洋紡)のSmaI部位にクローン化した。得られた5クローンのプラスミドDNAについて、市販のシーケンシング用キット(BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit; ABI社)及び自動DNAシーケンサー(ABI 377; ABI社製)を用いて塩基配列の決定を行なったところ、その内の1クローンに含まれるDNA断片の塩基配列が、前記のジャガイモGBSSの公知cDNA配列と完全に一致した。ジャガイモGBSS遺伝子(プロモーター及び構造遺伝子を含む)を含むこのプラスミドを、pAFT300と命名し、以下の実施例に使用した。

【0046】(2) イネ導入用プラスミドの調製

米でのジャガイモGBSSの発現用プロモーターには、

は差異が見出され、トウモロコシワキシタンパク質及びジャガイモGBSSとは反応性が低いことを認めた。

【0043】

イネワキシタンパク質プロモーターを用いた。また、ワキシタンパク質のアミロプラストへの移行を制御しているトランジットペプチドとしては、イネワキシタンパク質のトランジットペプチドを用いることとし、以下に示す手順に従って、ジャガイモGBSSのトランジットペプチドとの置換をレコンビナントPCRにより行なった。

【0047】具体的には、図1に示すプロトコールに従って実施した。まず、イネワキシタンパク質(プロモーター及び構造遺伝子を含む)を含むプラスミドpRWA111(Mol. Biol. Evol., 15, 978-987, 1998)を鋳型にして、プライマー対RP1及びRP2を用いるPCRを実施することにより、イネワキシタンパク質のトランジットペプチドを含むDNA断片Aを得た。同様に、前記実施例1(1)で調製したプラスミドpAFT300を鋳型にして、プライマー対RP3及びRP4を用いるPCRを実施することにより、ジャガイモ成熟GBSSのN末端側の一部を含むDNA断片Bを得た。なお、前記プライマーRP1～RP4の各塩基配列は、以下のとおりである:

RP1: 5'-TGCAGAGATCTTCCACAGCAACAGC-3'

RP2: 5'-CATTCCTTTCCGGTGGCGTACACGACGAC-3'

RP3: 5'-GTACGCCACCGGAAAGGGAATGAAGT-3'

RP4: 5'-GATGTCCGCGGGCTGCAAGGGCTGG-3'

【0048】得られたDNA断片A及びDNA断片Bを、それぞれ、アガロースゲル電気泳動法により分離及び精製した。続いて、精製したDNA断片A及びDNA断片Bを混合し、プライマー対RP1及びRP4を用いてレコンビナントPCRを実施した。前記DNA断片Aの3'末端側と前記DNA断片Bの5'末端側には、共通配列:

5'-GTACGCCACCGGAAAGGGAATG-3'

が存在するので、このレコンビナントPCRの結果、増幅したDNA断片は、イネワキシタンパク質のトランジットペプチドに、ジャガイモ成熟GBSSのN末端側

の一部が融合したDNA断片である。

【0049】前記レコンビナントPCRにより得られたPCR産物を、大腸菌ベクターpTZ18Uにクローン化し、プラスミドpAFT301を得た。このプラスミドpAFT301を制限酵素BglII及びSacIIで二重切断することにより得られた約400bpのDNA断片と、前記実施例1(1)で調製したpAFT300を制限酵素BamHI及びSacIIで二重切断することにより得られた約4.4kbのDNA断片とを連結し、プラスミドpAFT302を得た。このプラスミドpAFT302は、イネワキシイタンパク質のトランジットペプチドとジャガイモ成熟GBSSの全体とを含む。

【0050】一方、イネワキシイ遺伝子(プロモーター及び構造遺伝子を含む)を含む前記プラスミドpRWA111を、制限酵素BglII及びBamHIで二重切断(但し、BglIIについては部分分解)することにより得られた、イネワキシイ遺伝子プロモーターを含む約4kbのDNA断片を精製し、これを大腸菌ベクターpBluescriptKS+(東洋紡)のBamHI部位にクローン化し、プラスミドpAFT303を取得した。更に、先に得られたプラスミドpAFT302の約2kbのXbaI/KpnI-DNA断片を、T4DNAポリメラーゼ(宝酒造)により平滑末端化した後、前記プラスミドpAFT303のSmaI部位にクローン化し、プラスミドpAFT308を得た。このプラスミドpAFT308は、イネワキシイ遺伝子プロモーター、イネワキシイタンパク質のトランジットペプチド、及びジャガイモ成熟GBSSの全体を含む。

【0051】一方、ベクターとしては、アグロバクテリウム感染法用植物プラスミドpGAH(植物細胞工学、第4巻、第193頁～第203頁、1992年)を改変して用いた。すなわち、プラスミドpGAHを制限酵素BamHI及びHindIIIで二重切断して得られたネオマイシン耐性遺伝子を含むDNA断片を、大腸菌ベクターpKF3(宝酒造)のBglII/HindIII部位に置換挿入し、プラスミドpAFT5を得た。次に、プラスミドpAHC27(Transgenic Res., 5, 213-218, 1996)から、トウモロコシのユビキチンプロモーター、大腸菌βグルクロニダーゼ遺伝子、及びノバリンシンターゼのターミネーターを含むDNA断片を、HindIII/KpnI-DNA断片として切り出し、前記プラスミドpAFT5のHindIII/KpnI部位に置換挿入し、プラスミドpAFT14を得た。

【0052】更に、このプラスミドpAFT14を、まず、制限酵素SacIで切断し、T4DNAポリメラーゼ(宝酒造)により粘着末端を平滑末端に変換した後、制限酵素BglIIで切断して得られる約12kbのDNA断片と、先に得られたプラスミドpAFT308の約6kbのBamHI/EcoRV-DNA断片(イネワ

キシイ遺伝子プロモーター、イネワキシイタンパク質のトランジットペプチド、及びジャガイモ成熟GBSSの全体を含む)とを連結した後、大腸菌DH5αに形質転換し、アグロバクテリウム感染用植物プラスミドpAFT310を取得した。得られたプラスミドpAFT310の構造を、図2に模式的に示す。

【0053】(3) プラスミドpAFT310のアグロバクテリウムへの導入

イネへの遺伝子導入には、アグロバクテリウム・ツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*) EHA101(植物細胞工学、第4巻、第193頁～第203頁、1992年)を感染用宿主菌として用いた。前記実施例1(2)において大腸菌で作成したプラスミドpAFT310のアグロバクテリウムへの導入には、3者接合法(EMBO J., 2, 411-418, 1983)を用いた。すなわち、前記アグロバクテリウム・ツメファシエンスEHA101と、プラスミドpAFT310を有する大腸菌DH5αと、接合用ヘルパープラスミドpRK2013を有する大腸菌DH1との3者を、それぞれ、一般的な大腸菌培養培地であるLB液体培地で一晚培養した後、各培養液1mlを遠心し、その沈澱をLB液体培地1mlに再懸濁した。3種の培養懸濁液を各5μlずつ、LB寒天培地上の同一場所にスポットし、28℃で一晩培養した。生育したコロニーをLB液体培地に懸濁し、適当な希釈を行ない、2.5μg/mlテトラサイクリン及び25μg/mlカナマイシンを含むLB寒天培地に塗布し、28℃で3日間培養し、プラスミドpAFT310を有するアグロバクテリウムを取得した。

【0054】(4) アグロバクテリウム法によるイネへの遺伝子導入と形質転換体の選抜及び育成
イネへの遺伝子導入は土岐等の方法[Plant Molecular Biology Reporter, 15(1), 16-21, 1997]に従った。すなわち、日本晴モチの完熟種子を脱穀した後、70%エタノールで30秒間処理し、続いて、終濃度1:5%の次亜塩素酸ナトリウム溶液で30分間攪拌して殺菌した。滅菌水で十分に洗浄し、種子の水分を濾紙にて除いた後、N6D固形培地に播種し、28℃且つ照明下で3週間培養し、カルスを誘導した。一方、前記実施例1(3)で調製したアグロバクテリウムを、AB培地で28℃の暗所で2日間培養し、この菌体を、10mg/lアセトシリゴンを含むAAM培地に、液が僅かに白濁する程度の量で懸濁することにより、アグロバクテリウム懸濁液を調製した。

【0055】誘導した前記カルスをステンレスメッシュのかごに入れ、前記アグロバクテリウム懸濁液に2分間浸漬した後、滅菌した吸水紙(キムワイプ)の上にステンレスメッシュかごを置き、余分な菌液を除去した。アグロバクテリウムを感染させたカルス100片を、2N

6AS培地のシャーレ（シャーレ1枚当たり20片）上に置床し、28℃の暗所で3日間培養し、アグロバクテリウムを感染培養させた。

【0056】再びカルスをステンレスメッシュかごに入れて、N6D液体培地に浸し、洗い液が白濁しなくなるまでN6D液体培地を交換し、アグロバクテリウムを洗い流した。アグロバクテリウムを除去したカルスを入れたステンレスメッシュかごを、滅菌した汚紙の上に掛けて、余分な水分を除いた後、500mg/lカルベニシリン及び50mg/lハイグロマイシンを添加したN6D固形培地にカルスを置床し、28℃の照明下で3週間培養した。3週間の薬剤選抜培養で増殖してきたカルス50片を、250mg/lカルベニシリン及び50mg/lハイグロマイシンを含む再分化培地に移植して、28℃の照明下で3週間培養した。カルスからシュート及び根がそれぞれ1cm以上分化したところで、50mg/lハイグロマイシンを添加したホルモンフリー培地に移植し、28℃の照明下で培養を続けた。植物体がシャーレいっぱい成長したところで、培養土（ボンソル；住友化学）に鉢上げ馴化し、閉鎖系温室で形質転換植物体25株を育成し、その内、21株についてT1種子を採取することができた。

【0057】

【評価例1】《PCRによる形質転換体の解析》育成した形質転換植物体よりランダムに選んだ8個体の葉50mgより、CTAB法〔渡辺格監修・杉浦昌宏編集「クローニングとシーケンシング・植物バイオテクノロジー実験マニュアル」（1989年）農村文化社、第253頁～第255頁〕を用いてDNAを抽出し、DNA溶液50μlを調製した。このDNA溶液5μlとプライマーPWAX1及びPWAX2とを用いて、TaqDNAポリメラーゼ（宝酒造製）によるPCRを行なった。なお、前記プライマーPWAX1及びPWAX2は、ジャガイモGBSS遺伝子のコーディング領域内部を増幅することができるように設計したプライマーであり、その

《表2》

アミロース含量	モチ玄米粉 (mg)	アミロース (mg)
0%	2000	0
1%	1980	20
2.5%	975	25
5%	380	20

【0061】(2) アミロースの定量

以下にその具体的手順を示すヨード比色法〔Juliano法 (Cereal. Sci. Today, 16, 334-340, 1971) を一部改変したもの〕により、前記実施例1(4)で採種した形質転換体21株のT1種子の内、前記評価例2において比較的濃い青色を示した形質転換体4株（1個体当たり4粒）について、アミロース定量を実施した。なお、コントロールとしては、日本晴モチを使用した。

各塩基配列は、以下のとおりである：

PWAX1：5' -GAATGCCAAGGTCGCTTTCTG-3'

PWAX2：5' -TGCCGATGAAGCCAATCAAAG-3'

また、コントロールとしてプラスミドpAFT310を用いた。PCRの結果、全ての植物体でプラスミドpAFT310と同じサイズの増幅バンドを検出した。

【0058】

【評価例2】《米切片のヨードデンプン反応によるアミロースの定性的検出》前記実施例1(4)で採種した形質転換体21株のT1種子（1個体当たり5粒）を、それぞれ2等分し、その一方の半片を、染色溶液（0.02%ヨード、0.2%ヨードカリウム）で染色した。なお、コントロールとして、モチ米（アミロースを含有しない）とウルチ米（アミロースを含有する）とを用いた。室温に20時間置いた後の染色を観察したところ、11個体については、アミロースを含有しないモチ米と同じ無色であった。また、残る10個体については、アミロースを含有するウルチ米と同じ青色に染色された。しかし、青色に染色された10個体についても、染色濃度には個体間で濃淡がみられた。より詳細には、4個体においては、淡い青色を呈し、含有するアミロースが極少と推測されたが、6個体においては比較的濃い青色を呈した。更に、比較的濃い青色を呈した6個体も5粒間で濃淡が有り、T1種子がヘテロであることを示した。

【0059】

【評価例3】《ヨード比色法によるアミロース定量》

(1) 標準アミロース試料の作成

日本晴モチ玄米粉と、アミロース（Type III, ジャガイモ由来；シグマ社）とを、表2に示す量で秤量し、乳鉢中で充分に磨砕及び混合することにより、所定含量のアミロースを含有する標準アミロース試料4種を作成した。

【0060】

【0062】形質転換体のT1種子1粒を、玄米のまま質量測定した後、金槌で破碎して試験管に入れた。続いて、95%エタノール0.1mlを加えた後、1mol/l水酸化ナトリウム0.9mlを加え、100℃で10分間処理した。更に蒸留水5mlを加えた後、ポリトロンで磨砕し、新しい蒸留水でポリトロンをシャフトを洗い、この洗液も合わせて、全容量を20mlに調整し、更に充分に攪拌することにより、形質転換種子試料液とした。各形質転換体について、T1種子4粒からそ

れぞれ形質転換種子試料液4種(以下、「n-1」～「n-4」と称する)を調製した。一方、金槌で破碎したT1種子の代わりに、前記評価例3(1)で調製した各標準アミロース試料20mgを用いること以外は、前記操作を繰り返し、標準アミロース試料液を調製した。

【0063】各標準アミロース試料液及び各形質転換種子試料液1mlを、それぞれ試験管に採り、1mol/l酢酸0.5mlを加えて混和した後、ヨード液(0.2%ヨード、2%ヨードカリウム)0.1mlを更に添

加し、充分に混合した後、蒸留水で全容量を10mlに調整した。27℃で20分間反応させた後、波長620nmの吸光度を測定した。標準アミロース試料液で作成した標準曲線より、各形質転換種子試料液のアミロース含量を算出し、玄米1粒当たり20mgに補正換算した結果、表3に示すアミロース量を検出した。表3において、アミロース含量の単位は「%」であり、記号「ND」は、アミロースが検出されなかったことを示す。

【0064】

《表3》

形質転換体	n-1	n-2	n-3	n-4
W310-23	2.1	ND	1.0	0.8
W310-24	1.5	3.3	1.1	2.6
W310-25	2.1	ND	1.1	1.8
W310-43	1.8	2.0	0.8	0.1
日本晴モチ	ND	ND	ND	ND

【0065】

【発明の効果】本発明のトランスジェニックイネは、米アレルギーであるイネワキシタンパク質を含んでいない。また、本発明のトランスジェニックイネは、低アレルギー性非イネアミロース合成酵素を発現可能であるので、アミロースの合成に必須な酵素である前記イネワキシタンパク質を含んでいないにもかかわらず、その種子にアミロースを含有する。従って、本発明のトランス

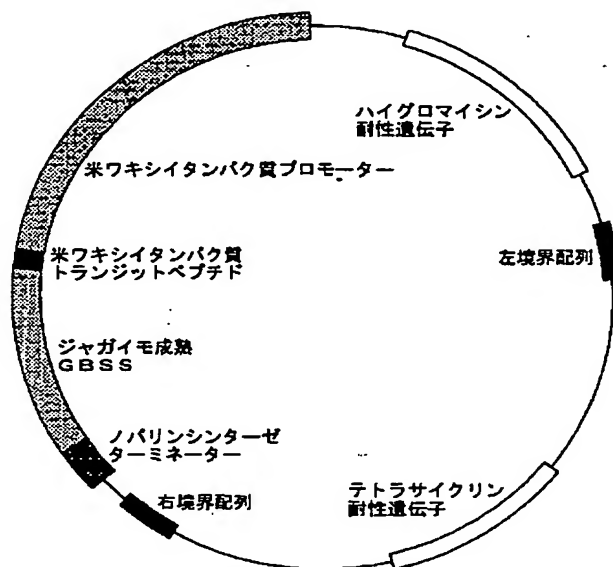
ジェニックイネによれば、低アレルギー性と良食味とを同時に満足することのできる米を得ることができる。

【図面の簡単な説明】

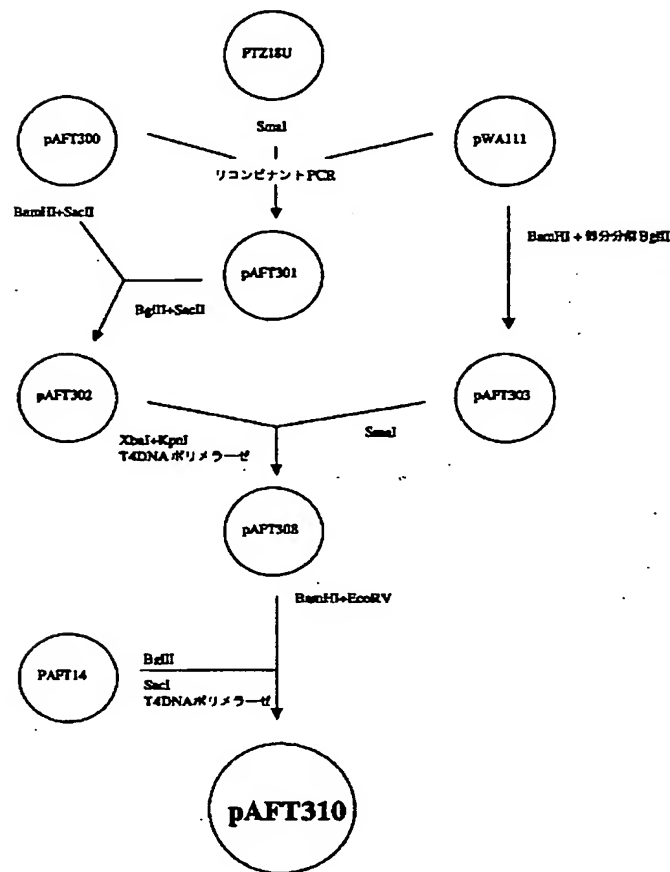
【図1】プラスミドpAFT310の構築手順を模式的に示す説明図である。

【図2】プラスミドpAFT310の構造を模式的に示す説明図である。

【図2】



【図 1】



フロントページの続き

- (72)発明者 安西 弘行
東京都荒川区東尾久8丁目4番1号 株式会社アレゲンフリー・テクノロジー研究所内
- (72)発明者 椿 和文
東京都荒川区東尾久8丁目4番1号 株式会社アレゲンフリー・テクノロジー研究所内
- (72)発明者 嶋田 禎祐
東京都荒川区東尾久8丁目4番1号 株式会社アレゲンフリー・テクノロジー研究所内
- (72)発明者 茂木 和之
東京都荒川区東尾久8丁目4番1号 株式会社アレゲンフリー・テクノロジー研究所内

- (72)発明者 杉山 宏
東京都荒川区東尾久8丁目4番1号 株式会社アレゲンフリー・テクノロジー研究所内
- (72)発明者 平野 博之
東京都足立区青井2-16-4-312
- (72)発明者 池澤 善郎
神奈川県横浜市金沢区能見台通24-8
- Fターム(参考) 2B030 AA02 AB03 AD08 AD20 CA17
CA19 CB02 CD03 CD07 CD09
CD10 CD13 CD17 CD21
4B024 AA05 AA08 BA07 BA80 CA04
DA01 EA04 FA02 FA07 FA10
GA17
4B065 AAS8X AAS8Y AAS9X AB01
AC14 BA02 BA25 BB37 CA22
CA27 CA53

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.